

(19) SE

(51) Internationell klass 6

C12N 7/00, 15/87, A61K 48/00, 39/12



PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET

(45) Patent meddelat 1996-04-22

(41) Ansökan allmänt tillgänglig 1993-05-01

(22) Patentansökan inkom 1991-10-30

(24) Löpdag 1991-10-30

(82) Stamansökans nummer

(88) Internationell ingivningsdag

(88) Ingivningsdag för ansökan om europeisk patent

(83) Deposition av mikroorganism

(30) Prioritetsuppgifter

(21) Patentansöknings-
nummer 9103183-1

Ansökan inkommen som:

☒ svensk patentansökan
☐ fullföljd internationell patentansökan
 med nummer

☐ omvandlad europeisk patentansökan
 med nummer

(73) PATENTHAVARE Leif Lindholm Konsult AB, Östra Björnvägen 8
430 41 Kullavik SE

(72) UPPFINNARE Leif Lindholm, Kullavik SE, Sven Enerbäck, Mölndal SE,
Örjan Strannegård, Stockholm SE

(74) OMBUD AWAPATENT AB

(54) BENÄMNING Virus-antikropps-komplex för införing av virus i
mammalieceller

(56) ANFÖRDA PUBLIKATIONER:

WO A1 8805077 (C12N 15/85), WO A1 9012087 (C12N 15/87),
WO A1 9102805 (C12N 15/86), WO A1 9104753 (A61K 47/48),
FR A1 2649119 (C12N 15/64)

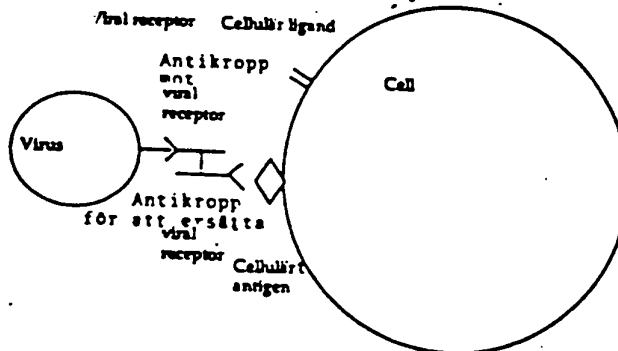
Proc.Natl.Acad.Sci. vol 86. 1989, 2448-51

Proc.Natl.Acad.Sci. vol 86. 1989, 9079-81

(57) SAMMANDRAG:

Komplex mellan ett virus, vars cellbindande receptor inaktiverats, och en antikropp, vilken har förmåga att interagera med ett specifikt antigen på ytan av en mammaliec cell, vilket antigen skiljer sig från den cellulära struktur som i annat fall skulle mediera bindning av viruset till cellytan, och vilket har förmåga att mediera inträngning av en virusvektor eller infektiöst virus i mammalieceller.

1. Ersättande antikropp konjugerad till blockerande antikropp



Föreliggande uppfinning avser ett komplex mellan ett virus, vars cellbindande receptor inaktiverats, och en antikropp. Uppfinningen är tillämpbar på situationer, där det är önskvärt att introducera virus i utvalda mammalie-celler för medicinska ändamål.

Virus intränger i mammalieceller efter bindning mellan en viral receptor och en kemisk struktur eller ligand i cellmembranet. Denna ursprungliga bindning är ett första och nödvändigt steg som leder till inträngning av virus i cellen och efterföljande transkription av det virala genomet och replikering av viruset inne i cellen. Relativt detaljerad kunskap kring strukturen och specificiteten hos många virala receptorer föreligger. När det exempelvis gäller influensavirus är specificiteten för virusreceptorn analog med specificiteten för antikroppar mot vissa tumör-antigener, i det att influensavirushemagglutinin binder till NeuAc2-3Gal-R, som är närvarande på samma strukturer som många humana tumörassocierade antigener.

Huvudändamålet med föreliggande uppfinning är att åstadkomma teknik som möjliggör införande av virus i mammalieceller för åstadkommande av önskad biologisk verkan i sådana celler.

Ett annat ändamål med uppfinningen är att möjliggöra virusvektorer eller infektionsvirus att riktas till specifika celler i en levande djurkropp.

Ännu ett ändamål är att åstadkomma teknik som gör det möjligt för virus att selektivt intränga i specifika celler i en levande djurkropp.

För dessa och andra ändamål åstadkommes genom uppfinningen ett komplex mellan ett virus och en antikropp, varvid cellbindningsreceptorn hos nämnda virus inaktiverats. Nämnda antikropp har förmågan att interagera med ett specifikt antigen på mammaliecellens yta, vilket antigen är olikartat den cellulära struktur som i annat fall skulle mediera virusets bindning till cellytan. Vidare har nämnda

antigen förmågan att mediera inträngning av en virusvektor eller infektiös virus i cellen.

Antikroppen kan endera vara en monoklonal antikropp eller ett fragment av en hel antikropp.

5 Antikroppen kan bindas till viruset på olika sätt, såsom genom kemisk konjugering, genom bindning av antikroppen till viruset via ett immunokemiskt reagens eller genom användning av en bifunktionell antikropp, som binder såväl till viruset som till ett cellulärt antigen.

10 Antikroppen kan även uttryckas på virusets ythölje efter kloning i virusets genom av gen eller gener för hela antikroppen eller fragment därav.

15 Inaktiveringen av den virala cellreceptorn i enlighet med föreliggande uppfinning kan ske på kemisk väg, medelst en specifik antikropp eller genom teknisk genmanipulation av det virala genomet. Genen för den virala cellreceptorn eller delar därav kan sålunda ersättas med antikropps-gener.

20 Komplexet enligt föreliggande uppfinning är avsett för medicinsk användning. Komplexet kan sålunda användas som vektor för introduktion av gener i celler eller organ för specifika terapeutiska ändamål. Komplexet kan även användas för att uttrycka virala antigener på cellytan för sådana ändamål eller det kan användas för att åstadkomma 25 en infektion i celler bärande det antigen, mot vilket antikroppen är reaktiv.

30 Genom användning av en antikropp som binder till ett cellulärt membranantigen som kan internaliseras i cellen kan virus bindas till cellen via en antikropp-antigenreaktion och sedan penetrera in i cellen och replikera förorsakande en viral infektion. Vidare kan eftersom antigener är kända, vilka är mer eller mindre unika för vissa typer av celler, virus selektivt riktas för att tränga in i och infektera specifika celler i kroppen. Exempel på sådana 35 antigener är vissa celldifferentierande antigener, såsom CD19 på B-celler och vissa tumörassocierade antigener på carcinomceller.

3

Uppfinningen gör det därför möjligt att rikta virus-
vektorer eller infektiösa virus till specifika celler i
kroppen med möjlighet att introducera funktionella gener i
utvalda celler eller organ in vivo eller för att åstadkom-
5 ma en viral infektion i vissa celler.

Följande tabell visar exempel på virala receptorer
och deras cellulära ligander. Receptorer såsom dessa är
tänkbara kandidater för användning inom ramen för förelig-
gande uppfinning.

10

TABELL 1

Vissa virala receptorer och deras cellulära ligander.

	Virus	Cellulär ligand	Distribution	Viral receptor
15	Epstein- Barr	CD21	B-celler	gp350/220
	Influen- sa A	Sialylglykolipid eller Sialylgly- koprotein inne- hållande	Många cell- typer	Hemagglutinin
20		NeuAc2-3Gal-R		
	Para- myxovirus prot	Kolhydrater inne- hållande sialin- syra	Många cell- typer	HN, H och G
25	Retrovirus	Protein	Många cell- typer	SU-protein

När virus replikerar i cellen nedrytes vissa virala
30 proteiner till peptider. Dessa peptider är bundna till
s.k. MHC-antigener inne i cellen och transporteras där-
efter till cellmembranet, där peptid-MHC-komplexet tjänar
som måltavla för ett mycket väsentligt försvarssystem, dvs
virusspecifika cytotoxiska T-celler, vilka i själva verket
35 dödar den virusinfekterade cellen. Vissa virus, exempelvis
retrovirus, integreras i värdcellens genom i form av pro-
virus som därefter kan replikeras. Retrovirus kan manipu-

leras genom metoder med "genetic engineering", så att de ej längre replikerar men kan användas som vektorer för introduktion av nya gener i mammalieceller. Användningen av retrovirala vektorer erbjuder ett praktiskt verktyg för genterapi i människor. För närvarande är emellertid användningen av retrovirala vektorer i stor utsträckning begränsad till celler av hemopoietiskt ursprung.

Det finns ett flertal tekniska vägar genom vilka den cellbildande receptorn i ett virus kan ersättas med en antikropp. Sådana principiella vägar är uppställda nedan och illustreras på bilagda ritningar, nämligen Figurerna 1 till 3.

1. Den virala receptorn kan blockeras med en antikropp, som i sin tur kan konjugeras med en antikropp av önskad specificitet.

2. Den virala receptorn kan inaktiveras genom kemiska eller gentekniska förfaranden och den ersättande antikroppen kan sedan kemiskt kopplas direkt till viruspartikeln.

3. Genen för den virala receptorn kan ersättas med gener för den ersättande antikroppen.

De möjligheter som föreliggande uppfinning erbjuder är många. Ett område är genterapi på människor, där retrovirala vektorer redan använts för att introducera gener i humana celler för terapeutiska ändamål. Föreliggande uppfinning kan förväntas förhöja effektiviteten av denna teknik, ävensom möjliggöra nya användningsområden, såsom avsiktlig introduktion av gener i tumörceller.

Ett annat område är immunoterapi av tumörsjukdomar, där uppfinningen kan användas för genterapi eller för att introducera virus i tumörceller med avsikten att uttrycka virala antigener vid cellytan så att cellerna omvandlas till tänkbara måltavlor för de virusspecifika cytotoxiska T-cellerna.

Uppfinningen kommer att illustreras ytterligare i det följande genom konkreta exempel, vilka ej avser att inskränka uppfinningens omfattning på annat sätt än som definieras genom bilagda patentkrav.

EXEMPEL 1

Följande exempel visar att bindningsspecificiteten för ett virus kan blockeras och ersättas med den för en antikropp. I exemplen användes bindningen och infektionen av influensavirus A/PR/8 till humana koloncarcinomceller Colo 205. Cellbindningen för influensavirus är beroende av en specifik bindningsmolekyl, Hemagglutinin (HA), som är närvarande i det virala höljet och som binder till NeuAc2-3Gal-R närvarande på många mammalieceller.

I detta exempel användes följande strategi.

1. Bindningen av A/PR/8 till målcellen blockerades medelst den monoklonala antikroppen HK-PEG-1 mot influensa HA (Koprowski H, Gerhard W och Croce CM: Production of antibodies against influenza virus by somatic cell hybrids between mouse myeloma and primed spleen cells. Proc.Natl. Acad.Sci USA, Vol. 74, pp 2985-2988, 1977). Cellinjen producerande denna antikropp kan erhållas från the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA:

2. En ny bindningsspecificitet påfördes viruset genom en annan antikropp som kemiskt konjugerats till HK-PEG-1-antikroppen som användes för att blockera virusets naturliga cellbindning. Antikroppen OKT9 (US-patentet 4,364,934) som reagerar med transferrinreceptorn på prolifererande mammalieceller användes för detta ändamål. En antikropp mot transferrinreceptorn användes på grund av att transferrinreceptorn snabbt och konstitutionellt internaliseras av cellerna jämte en antikropp som omsatts med receptorn (Schwartz AL: Cell Biology of Intracellular Protein Trafficking, Ann.Rev.Immunol., Vol 8, pp 195-229, 1990). Cellinjen som producerar OKT9-antikroppen kan erhållas från the American Type Culture Collection.

Den förväntade duala effekten på virusbindningen av antikroppskonjugatet som användes visas schematiskt i Fig. 4 av ritningarna.

EXEMPEL 2

Influenta A/PR/8 erhöills från Statens Bakteriologiska Laboratorium, S-10521 Stockholm, Sverige.

5 HK-PEG-1 och OKT9-antikropp

- Hybridomceller erhöills från the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA. Hybridomceller odlades i Iscoves medium supplemeterat med 10% fetalt kalvserum. Antikroppsproduktion utfördes i dialysrör (Sjögren-Jansson E och Jeansson S: Large-Scale Production of Monoclonal Antibodies in Dialysis Tubin, J.Immunol.Meth., Vol 84, pp 359-364, 1985) och antikroppar renades genom affinitetskromatografi på ett Protein A-Sepharos CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Sverige) (Ey PL, Prowse SJ och Jenkin CR: Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. Immunochemistry Vol 15, pp 429-436, 1978).

20 Antikropps-konjugat:

- Antikropps-konjugat framställdes under användning av det heterobifunktionella reagenset N-succinimidyl (2-pyridylditio)-propionat, SPDP (Pharmacia, Uppsala, Sverige) (Carlsson J, Drevin H och Axén R: Protein thiolation and reversible protein protein conjugation. N-succinimidyl 3(2 pyridyldithio)propionate - a new heterobifunctional reagent. Biochem.J., Vol 173, pp 723-737, 1978). Konjugaten renades från oreagerad antikropp genom gelfiltrering på Superdex 200 (Pharmacia, Uppsala, Sverige).

30

Titrering av virus genom Hemagglutination:

- Hemagglutination av röda blodkroppar av human blodgrupp 0 utfördes 96-brunnars tråg under användning av standardmetoder (Mahy BWJ, ed: Virology, a practical approach. IRL Press, Oxford, 1985).

Colo 205 koloncarcinomceller erhöjls från the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, och innehölls i Iscoves medium med 10% fetalt kalvserum.

5

Resultat

Inhibering av viral bindning genom HK-PEG-1-antikropp och HK-PEG-1-konjugat

Inhibering av viral bindning till dess cellulära li-
 10 gand uppmättes genom hemagglutinationsmetoden. Virus, 800 HAU (HemAgglutinating Units)/ml inkuberades i 1 timme vid rumstemperatur med antikropp vid olika koncentrationer och tilläts sedan agglutinera humana röda blodkroppar. HK-PEG-1-antikropp medförde fullständig inhibering av agglutina-
 15 tion vid 7µg/ml eller mer, medan motsvarande siffra för HK-PEG-1 konjugerade till OKT9 var 10µg/ml.

Förmåga för HK-PEG-1-konjugat att mediera viral infektion

HK-PEG-1 eller HK-PEG-1-konjugerad till OKT9 inkube-
 20 rades med 100 HAU av A/PR/8-virus i 1 timme vid rumstemperatur för att blockera HA-molekylerna i det virala höljat. Därefter inkuberades virusberedningarna tillsammans med 2×10^6 Colo 205-celler i 1 ml PBS i 1 timme vid 37°C. Cellerna tvättades tre gånger med PBS genom centrifugering,
 25 suspenderades i 1 ml komplett medium och inkuberades vid 37°C i 24 timmar. Närvaro av virus i mediet bestämdes genom hemagglutination. Resultaten visas i Tabell 2 nedan. Det är uppenbart, att konjugationen av OKT9 till HK-PEG-1 tillåter viruset att infektera cellerna genom att ge viru-
 30 set ett nytt bindställe i cellmembranet så att därigenom undvikas den inhibition som förorsakas av enbart HK-PEG-1-antikroppen. Den minskande infektiviteten med stigande antikroppskoncentration är förmodligen en effekt av bildningen av stora virus-antikroppskomplex, eftersom sådana
 35 komplex tas mindre effektivt upp i cellen.

TABELL 2

Produktion av virus uppmätt genom hemagglutination genom
Colo 205-celler infekterade med Influenta A/PR/8 förbe-
5 handlad med olika antikroppar.

	<u>Antikropp</u>	<u>Koncentration (µg/ml)</u>	<u>HA-titer</u>
	Ingen		1/16
	HK-PEG-1	30	Negativ (<1/2)
10	HK-PEG-1	100	Negativ (<1/2)
	HK-PEG-1	300	Negativ (<1/2)
	HK-PEG-1/OKT9	30	1/8
	HK-PEG-1/OKT9	100	1/4
15	HK-PEG-1/OKT9	300	1/2

20

25

30

35

PATENTKRAV

1. Komplex mellan ett virus, som har förmåga att intränga i mammalieceller efter bindning mellan ett viralt adsorptionsprotein och en kemisk struktur eller ligand i cellmembranet, men vars virala adsorptionsprotein inaktiverats, och en antikropp, vilken har förmåga att interagera med ett specifikt antigen på ytan av en mammalieceld, vilket antigen skiljer sig från det virala adsorptionsproteinet som i annat fall skulle mediera bindning av viruset till cellytan, och vilket har förmåga att mediera inträngning av en virusvektor eller infektiöst virus i mammalieceller.
2. Komplex enligt patentkravet 1, vari antikroppen är en monoklonal antikropp.
3. Komplex enligt patentkravet 1, vari antikroppen är ett fragment av en hel antikropp, vare sig den framställts på kemisk väg eller genom expression av antikroppsgener eller DNA-sekvenser innehållande information härledd från antikroppsgener.
4. Komplex enligt något av de föregående patentkraven, vari antikroppen är bunden till viruset genom kemisk konjugering.
5. Komplex enligt något av de föregående patentkraven, vari antikroppen är bunden till viruset via ett immunokemiskt reagens, såsom en anti-species-antikropp, avidin eller streptavidin.
6. Komplex enligt något av de föregående patentkraven, vari antikroppen är en bifunktionell antikropp bindande till såväl ett virus som till ett cellulärt antigen.
7. Komplex enligt något av patentkraven 1 till 3, vari antibindningsställe eller -ställena är uttryckta på den virala ytan efter kloning av antikroppsgen eller -gener eller DNA-sekvens eller -sekvenser kodande för en antikroppsbindande struktur eller strukturer i det virala genomet.

8. Komplex enligt något av patentkraven 1 till 3, vari antikroppen är reaktivt med ett cellulärt antigen med förmåga att mediera inträngning av ett virus i en cell.

9. Komplex enligt något av de föregående patentkraven, vari det virala adsorptionsproteinet inaktiverats på
5 kemisk väg, medelst en specifik antikropp eller genom genteknologisk manipulation av det virala genomet.

10. Komplex enligt något av patentkravet 1 till 8, vari genen för det virala adsorptionsproteinet eller delar
10 därav ersatts med antikroppsgener.

11. Komplex enligt något av de föregående patentkraven för medicinsk användning.

12. Komplex enligt patentkravet 11 för användning som vektor för introduktion av gener i celler eller organ för
15 terapeutiska ändamål.

13. Komplex enligt patentkravet 12 för användning för att uttrycka virala antigener på cellytan för terapeutiska ändamål.

14. Komplex enligt patentkravet 12 för användning för
20 terapeutiska ändamål för att förorsaka en infektion i celler bärande det antigen, mot vilket antikroppen är reaktiv.

25

30

35

1. Ersättande antikropp konjugerad till blockerande antikropp

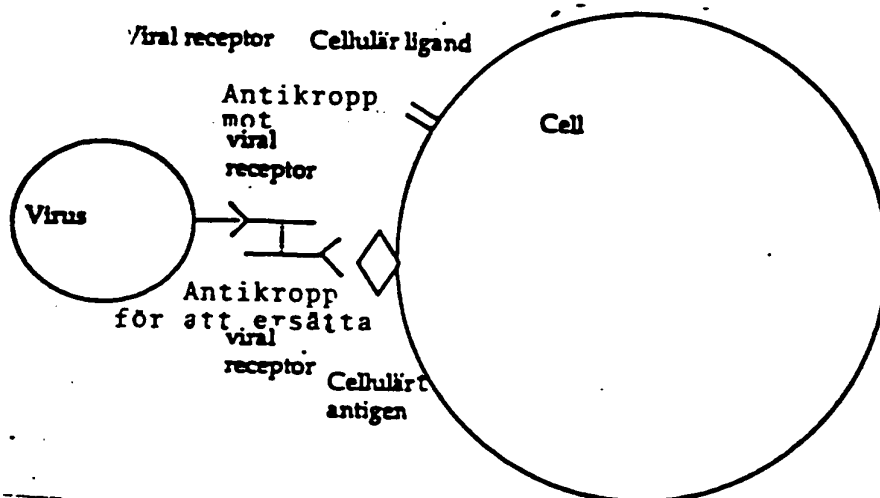


FIG. 1

2. Ersättande antikropp konjugerad till virus

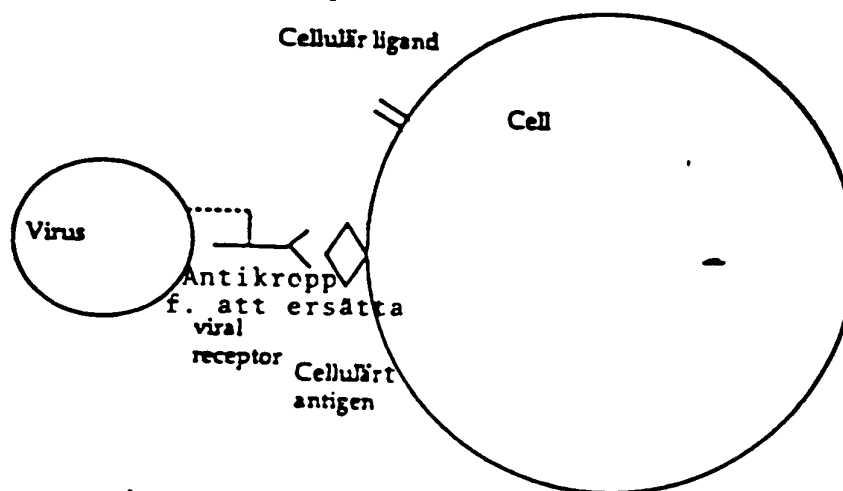


FIG. 2

3. Viral gen för receptor ersatt med antikroppsgener

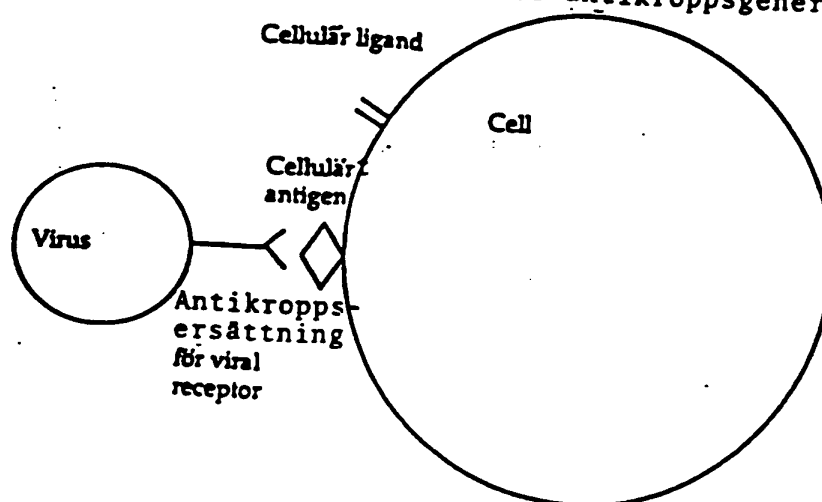


FIG. 3

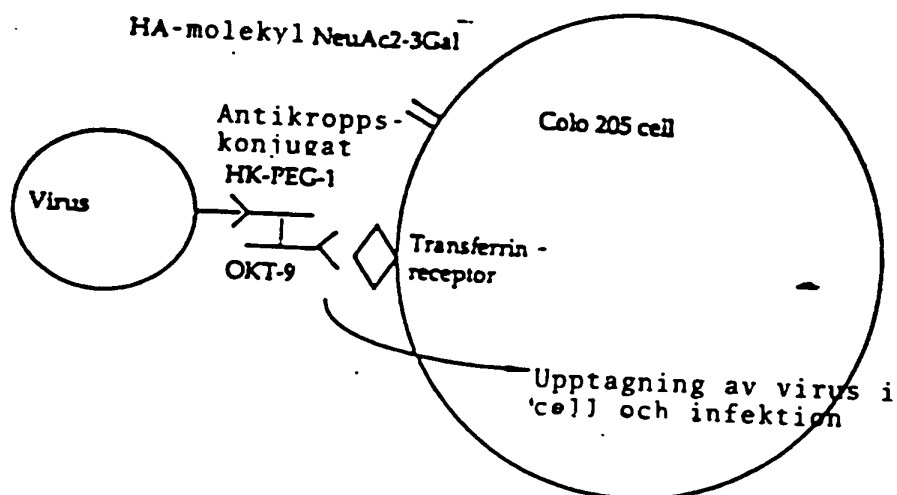


FIG. 4